

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 小林 覚

### 論文題目

#### Identification of novel fusion genes with 28S ribosomal DNA in hematologic malignancies

### 論文内容の要旨

造血器腫瘍や軟部肉腫では染色体の転座や逆位、欠失により融合遺伝子が形成されることが知られている。これらの融合遺伝子の多くはインフレームで融合し、それにより産生された融合タンパクが腫瘍発生に関与する。これらの融合タンパクは腫瘍の病型や予後とも関連し、また、微小残存病変のマーカーや治療標的の指標となる。近年はこのような融合遺伝子が、前立腺がんや肺がんでも多く見つかり、その重要性がますます認識されている。しかし、融合遺伝子の中には免疫グロブリン遺伝子や T 細胞受容体遺伝子との融合によりその相手遺伝子を活性化することによって腫瘍化に関与するような、融合転写産物や融合蛋白を形成しないものもある。さらに、最近我々の研究室で同定した多発性骨髄腫における *PVT1-NBEA* と *PVT1-WWOX* のように、蛋白質をコードしない遺伝子 (*PVT1*) が関与する融合遺伝子 (融合転写産物) の存在も明らかになった。この *PVT1* との融合遺伝子は脳腫瘍や肺がんでも同定され、さまざまな腫瘍に広く関与しているのではないかと考えられた。これらは、このようなこれまで知られていない新しいタイプの遺伝子異常が他にもまだ存在する可能性を示唆するものである。

我々は、腫瘍化における染色体異常の役割を明らかにすることを目的として研究を行ってきたが、そのような中でリボソーム合成に関係する遺伝子 28S ribosommal DNA (*RN28S1*) が関与する複数の新規融合遺伝子を同定した。15 歳男性に発症した t(6;14)(q25;q32) を有する混合表現型 (T/骨髄性) 急性白血病の白血病細胞を用いて FISH 法を行ったところ、14q32 上の *BCL11B* と 6q25 領域の遺伝子が融合している可能性が考えられた。そこで cDNA バブル PCR 法を用いて、*BCL11B* の転座相手遺伝子の同定を試みた。その結果、130bp の PCR 産物を含む一つのクローンで *BCL11B* のエクソン 3 (34bp) と 28S リボソーム DNA の配列 (96bp) との融合を確認した。この結果は RT-PCR でも確認できた。ところが、*BCL11B* の転座相手の *RN28S1* が予想した 6q25 上の遺伝子ではなかったことから、この融合遺伝子は t(6;14)(q25;q32) とは関係なく形成されている可能性が考えられた。そこで、同様の融合が他の造血器腫瘍細胞株においても存在しないか検討を行った。*BCL11B* と *RN28S1* に設定したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、複数の細胞株で PCR 産物が認められた。パーキットリンパ腫細胞株 HBL-5 では 367bp の PCR 産物が得られ、*RN28S1* (248bp) が *IGKV3-20* (119bp) と融合していた。また、多発性骨髄

腫細胞株 KMS-18 においては 441bp の PCR 産物が得られ、*RN28S1* (379bp) と *COG 1* (62bp) が融合していた。これらの融合は、新たに設定したそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR によって確認された。*BCL11B* のプライマーの配列と同定した *IGKV3-20* および *COG 1* の配列を比較した結果、20 塩基中 14 塩基が一致している部分にプライマーがアニールすることで融合転写産物が増幅されていたことが判明した。

*RN28S1* が関与する融合遺伝子は、これまでに胃悪性リンパ腫の 1 例での *BCL6* 遺伝子との融合が報告されているが、詳細な解析はなされていない。*RN28S1* は蛋白質に翻訳されず、3 つの融合相手遺伝子の切断点はいずれもエクソン内だった。また、*BCL11B* との融合は正常の転写の方向とは逆向きに起こっていた。これらのことは、この融合により相手遺伝子の正常な機能が阻害されることが腫瘍化に関与している可能性を示唆する。一方、リボソーム DNA (rDNA) とがんとの関係についてはいくつかの報告がある。rDNA の異常は肺がん、結腸がんにおける rDNA の高頻度の再構成や前立腺がんでの rDNA の高発現が報告されている。rRNA の転写とリボソーム合成の調節は、PI3 キナーゼ/mTOR、MYC、RAS/ERK 経路などいくつかのがん関連遺伝子が関与する経路によって制御されており、rDNA の異常が腫瘍形成に関与していると考えられている。また、*RN28S1* はリボソーム合成の働きを担う MYC の結合部位を 3 つ有している。今回同定した *RN28S1* 融合遺伝子では、切断点よりも 5' 側に MYC の結合部位が存在していることから、3' 側で相手遺伝子と融合している *RN28S1* は MYC の結合サイトを有しておらず、MYC を介する rRNA 合成に異常が生じている可能性がある。切断箇所は 600bp の範囲内に集中しており、rDNA の繰り返し配列内での組換えのホットスポットであることが示唆される。同定した 3 つの融合相手遺伝子も腫瘍化に密接に関与している。*IGK* は免疫グロブリン軽鎖構成を担っており、B 細胞腫瘍での t(2;8)(p11;q24) による再構成が知られている。*BCL11B* は T 細胞腫瘍での再構成が知られており、これまでに *TLX3-BCL11B*、*BCL11B-TRDC* や *HELIOS-BCL11B* の染色体転座が報告されている。*COG1* はゴルジ複合体構成に必須であり、ゴルジ複合体はグルコシル化反応や小胞輸送に関わっている。COG には 1~8 までのファミリー遺伝子が存在し、その中の *COG5* は子宮平滑筋腫において *HMGA2* との融合が報告されている。rDNA の腫瘍形成における役割については今後の更なる検討が必要であるが、今回の発見は腫瘍発生メカニズムの解明だけでなく、ヒトのゲノム構成やリボソーム DNA の機能の解明にも貢献するものと考えられた。